



Фітохімічні дослідження
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЧАСОПИС

<http://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/pharm-chas>



УДК 543.544.5:615.32:582.688.3:547.972.3

DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2020.3.11424>

ВЕРХ-ДОСЛІДЖЕННЯ АГЛІКОНІВ ФЛАВОНОЇДІВ СУХОГО ЕКСТРАКТУ ПАГОНІВ ЧОРНИЦІ

Л. В. Вронська

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

vronska_liudmyla@ukr.net

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:
05.08.2020

Після доопрацювання / Revised:
20.08.2020

Прийнято до друку / Accepted:
26.08.2020

Ключові слова:

пагони чорниці;
сухий екстракт;
аглікони флавоноїдів;
кверцетин;
кемпферол;
мірицетин;
ВЕРХ.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. ВЕРХ-дослідження складу і вмісту агліконів флавоноїдів у сухому екстракті пагонів чорниці.

Матеріали і методи. Сухий екстракт пагонів чорниці отримували методом дробної мацерації; екстрагент – етанол (70–50 %, об/об); екстракційне співвідношення сировина-екстрагент – 1:9–15, кратність екстрагування – 5, час одного екстрагування – 24 год. У дослідженні застосовували: роторний випарювач Laborota 4011 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Німеччина), сушильну шафу СП-100 (UOSLAB, Україна), аналітичну вагу Mettler Toledo XP205DR (Mettler Toledo, Швейцарія), ультразвукову баню Bandelin Sonorex digitec (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Німеччина), рідинний хроматограф Agilent 1200 із детектором G1315D DAD Detector («Agilent», США), хроматографічну колонку Kromasil 100 C18 (0,125 м x 4,6 мм, 5 мкм, Supelco, США), стандарти агліконів (Sigma-Aldrich), хімічні реактиви аналітичної чистоти і розчинники для градієнтного елюювання (Sigma-Aldrich, Macron Fine Chemicals™).

Результати й обговорення. Хроматографування проб сухих екстрактів пагонів чорниці після кислотного гідролізу дозволило ідентифікувати за часом утримування і ходом електронних спектрів поглинання три аглікони: мірицетин, кверцетин і кемпферол. При кількісному визначенні їхнього вмісту у трьох серіях екстракту знайдено: кверцетину – 0,647–0,724 %, мірицетину – 0,068–0,098 % і кемпферолу – 0,030–0,034 %. Отримані результати узгоджуються з даними літератури, а саме – домінування кверцетину і присутність мірицетину і кемпферолу або одного із них у незначних кількостях у стеблах, листі і плодах чорниці.

Висновки. Агліконовий профіль флавоноїдів сухого екстракту пагонів чорниці представлений трьома сполуками – кверцетином, мірицетином і кемпферолом, вміст кверцетину є найвищим, а кемпферолу – найнижчим. Кількісне визначення вмісту агліконів (окреме/сумарне) методом ВЕРХ запропоновано застосовувати як показник якості сухого екстракту пагонів чорниці.

Вступ. У процесі стандартизації лікарської рослинної сировини (ЛРС) і екстрактів на її основі необхідне вивчення складу і вмісту біологічно активних

речовин (БАР), які забезпечують прояв специфічної активності і застосування при певних захворюваннях. Використання селективних методів аналізу для

ідентифікації БАР, а отже, ЛРС і її екстрактів, є фармакопейним підходом [1]. При встановленні кількісного показника якості ЛРС і її екстрактів застосовують сумарні аналітичні методи, наприклад, спектрофотометрію. Це також відповідає загально визнаним фармакопейним вимогам. Проте часто трапляється, що обраний при встановленні кількісного критерію клас БАР у подальшому неможливо визначати в готовому багатокомпонентному ЛЗ, наприклад, вміст танінів, поліфенолів, органічних кислот. Тому стандартизація окремих фармакопейних видів ЛРС вимагає доопрацювання і вдосконалення, як і стандартизація більшості екстрактів ЛРС.

Якість пагонів чорниці, на відміну від листя чорниці, контролюється за вмістом поліфенолів [2]. Оцінити вміст поліфенолів в екстракті пагонів чорниці можна спектрофотометричним методом, як і у випадку сировини. Проте для вивчення стабільності екстракту, як і оцінки його кількості у комбінованих ЛЗ, необхідно визначати інші, більш специфічні, класи БАР. У пагонах чорниці присутня значна кількість гідроксикоричних кислот і флавоноїдів [3–12]. Динаміка їхнього вмісту може бути простежена в процесі зберігання і слугуватиме об'єктивним критерієм при визначенні умов зберігання і встановленні термінів придатності як ЛРС, так і її екстракту та готового ЛЗ з ним. ЛРС містить флавоноїди переважно у формі глікозидів, які містять різні вуглеводи, що ускладнює умови аналізу і вивчення динаміки їхнього вмісту через необхідність придбання та використання більшої кількості стандартних зразків, які інколи є невідомими, а часто і практично недоступними. Тому раціональним є, наприклад, підхід нехтування вуглеводною частиною і врахування лише агліконової форми при спектрофотометричному визначенні суми флавоноїдів у різних видах ЛРС. Для цього здійснюють гідроліз глікозидів, внаслідок чого склад отримуваних агліконів є більш однотипним, що приводить до стійкості положення максимуму в електронному спектрі поглинання комплексу флавоноїдів-агліконів з алюмінієм хлоридом [1]. Такий же підхід застосовано у монографіях на гінго листя та кількісно визначений гінго екстракт сухий, рафінований, коли для ВЕРХ-визначення суми флавоноїдів застосовують гідроліз глікозидних форм і нормують агліконовий склад та їхній сумарний вміст [1, 2].

Результати дослідження ЛРС листя, пагонів чорниці [3–14] свідчать, що флавоноїди чорниці є переважно глікозидними формами кверцетину, в окремих роботах зазначено про глікозидні форми кемпферолу, а в інших – мірицетину. Таким чином, селективне вивчення аглікового складу наразі є недостатнім, але необхідним для напрацювання об'єктивних показників і критеріїв якості в процесі стандартизації як самої ЛРС, так і її екстрактів. Раніше було розроблено спектрофотометричну методику визначення сумарного вмісту флавоноїдів-агліконів, отриманих

внаслідок кислотного гідролізу, у сухому екстракті пагонів чорниці спектрофотометричним методом [15] у перерахунку на кверцетин.

Мета роботи – ВЕРХ-вивчення складу і вмісту агліконів флавоноїдів у сухому екстракті пагонів чорниці.

Матеріали і методи.

Об'єкт дослідження – склад і вміст агліконів флавоноїдів у сухому екстракті пагонів чорниці.

Матеріал для дослідження

Сухий екстракт пагонів чорниці отримували методом дробної мацерації; екстрагент – етанол (70–50 %, об/об); екстракційне співвідношення сировина – екстрагент – 1:9–15, кратність екстрагування – 5, час одного екстрагування – 24 год. Отриманий рідкий витяг відстоювали, фільтрували, згущували і висушували.

Обладнання

Для відгонки екстрагентів застосовували роторний випарювач Laborota 4011 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Німеччина). Висушування екстрактів здійснювали при температурі 45 °C у сушильній шафі СП-100 (UOSLAB, Україна) полицьовим способом. Зважування проводили на аналітичній вазі Mettler Toledo XP205DR (Mettler Toledo, Швейцарія). При підготовці проб застосовували ультразвукову баню Bandelin Sonorex digitec (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Німеччина). Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Agilent 1200 із детектором – діодна матриця G1315D DAD Detector («Agilent», США), застосовували розділення на хроматографічній колонці Kromasil 100 C18 (0,125 м x 4,6 мм, 5 мкм, Supelco, США).

Реактиви

У дослідженні використовували метанол, етанол, етилацетат, ацетон, гексаметилентетрамін, натрію сульфат, хлоридну кислоту аналітичної чистоти або чистоти, придатної для градієнтного елюювання у ВЕРХ (Sigma-Aldrich, Macron Fine Chemicals™), стандартні зразки кверцетину, нарингеніну, кемпферолу, апігеніну, ізорафнетину, лютеоліну і мірицетину (Sigma-Aldrich).

Випробовуваний розчин

Гідроліз глікозидів флавоноїдів сухого екстракту пагонів чорниці здійснювали за умов, описаних раніше [15]. До наважки екстракту додавали ацетон і розчин хлоридної кислоти та, нагріваючи на киплячій водяній бані впродовж 2 год, проводили гідроліз глікозидів флавоноїдів. Аглікони флавоноїдів кількісно екстрагували етилацетатом, з отриманого етилацетатного екстракту відганяли розчинник у ротаційному випарювачі при температурі 40 °C. Сухий залишок розчиняли в метанолі, поміщаючи колбу в ультразвукову баню на хв при температурі 25–30 °C, додавали хлоридну кислоту, перемішували та хроматографували.

Стандартні розчини

10 мг стандартного зразка відповідного аглікона поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 20 мл метанолу і розчиняли, доводили об'єм розчину

метанолом до позначки і перемішували. У мірну колбу відбирали необхідну кількість стандартного розчину, додавали розчин 250 г/л хлоридної кислоти, перемішували та хроматографували.

Умови ВЕРХ-дослідження

Хроматографічна колонка: Kromasil 100 C18 розміром 0,125 м x 4,6 мм з розміром часток 5 мкм (Supelco, США).

Рухомі фази: **A** – 0,3 г/л розчин фосфатної кислоти (рН 2,0), **B** – метанол.

Програма елювання: 0–1 хв: 60 % фази **A**; 1–20 хв: 60 → 45 % фази **A**; 20–21 хв: 45 → 0 % фази **A**; 21–25 хв: 0 % фази **A**; 25–27 хв: 0 → 60 % фази **A**; 27–35 хв: 60 % фази **A**.

Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично при довжині хвилі 370 нм.

Інжекція: 10 мкл.

Результати й обговорення. За описаних хроматографічних умов вибрані аглікони флавоноїдів добре розділяються. Наступні часи утримування агліконів отримали з хроматограм стандартних розчинів: мірицетин – 8,9 хв, кверцетин – 14,7 хв, нарингенін – 15,5 хв, лутеолін – 16,6 хв, кемпферол – 20,5 хв, апігенін – 21,4 хв, ізорамнетин – 21,8 хв.

При хроматографуванні випробовуваних розчинів сухих екстрактів пагонів чорниці спостерігали піки речовин, три з яких за часом утримування і ходом електронних спектрів поглинання були ідентифіковані як мірицетин, кверцетин і кемпферол (рис. 1).

Отже, сухі екстракти пагонів чорниці містять флавоноїди агліконів мірицетину, кверцетину і кемпферолу у поєднанні із різними вуглеводами.

У зразках листя чорниці, зібраної у центральній Європі, методами адсорбційної, паперової і тонкошарової хроматографії було ідентифіковано кверцетин-3-рамнозид (кверцитрин), кверцетин-3-глюкозид (ізо-кверцитрин), кверцетин-3-арабінозид (авікулярин) [16, 17], а пізніше, за допомогою хромато-мас-спектрометричних технік, у плодах чорниці було ідентифіковано аглікони – мірицетин і кверцетин [18–20] та кемпферол [20]. За даними [20], у плодах чорниці з усіх фенольних сполук, отриманих після гідролізу, вміст кверцетину є найвищим – 21,4 %, кемпферолу – 2,6 % і мірицетину – 6,2 % від загального вмісту фенольних сполук. Після лужного гідролізу в листі чорниці було ідентифіковано кемпферол і кверцетин [21]. Методом ВЕРХ у листі чорниці були кількісно визначені кверцетин-3-глюкуронід (1,02–0,83 %) і кверцетин-3-галактозид (гіперозид, 0,22–0,16 %) та додатково ідентифіковані ізо-кверцитрин, кверцитрин і авікулярин, а також було встановлено, що вищий вміст флавоноїдів спостерігається у молодому листі [22]. За результатами дослідження впливу фази зростання на вміст фенольних сполук, максимальний вміст похідних кверцетину спостерігали у зразках сировини, зібраної у липні [3]. Дослідженнями, результати якого опубліковані в [4], встановлено, що флавоноїди листя чорниці представлені кверцетин-3-О-глюкуронідом і кемпферол-3-О-глюкуронідом – відповідно, 104 мг і 42 мг на 100 г сухої сировини. Домінуючим агліконом рослин роду *Vaccinium* визначено кверцетин [23]. У дослідженні [24] встановлено, що флавоноїди плодів чорниці представлені мірицетином і кверцетином (домінуючий). У роботі [25] вказується, що кверцетин (домінуючий) і кемпферол є

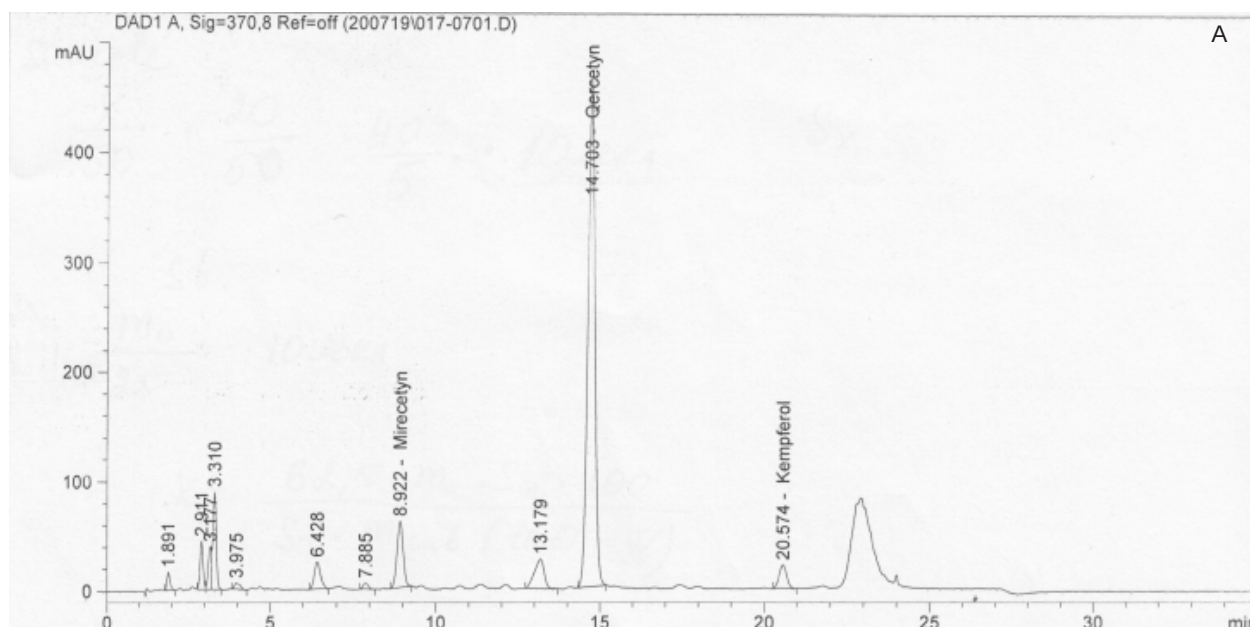


Рис. 1. Хроматограми, отримані для випробовуваних розчинів різних серій (А, Б) сухих екстрактів пагонів чорниці в умовах визначення агліконів флавоноїдів.

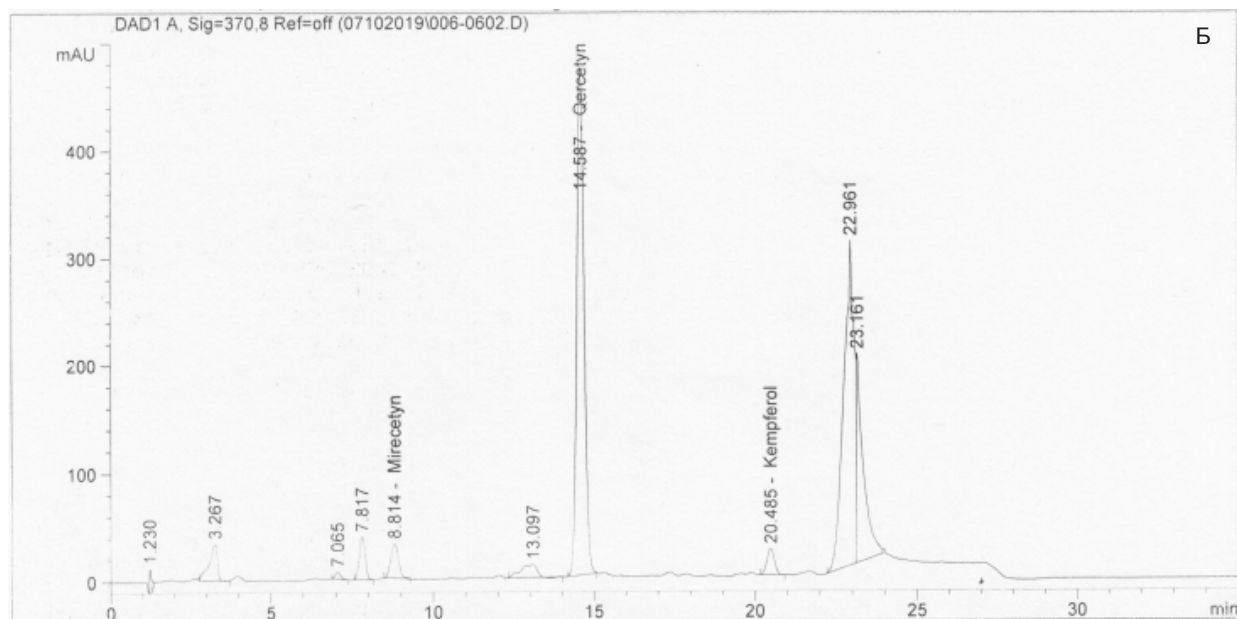


Рис. 1 (продовження). Хроматограми, отримані для випробовуваних розчинів різних серій (А, Б) сухих екстрактів пагонів чорниці в умовах визначення агліконів флавоноїдів.

агліконами флавоноїдів листя чорниці, а також встановлено, що зелене листя містить менше флавоноїдів, ніж червоне. Методом рідинної хроматографії з мас-детекцією було проаналізовано скандинавські зразки листя чорниці, зібрані у жовтні, і виявлено, що флавоноїди представлені сполуками: кверцетин-3-глюкуронід, кверцетин-3-О-β-галактозид, кверцетин-3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилглутароїл)]-α-рамнозид, кверцетин-3-О-α-арабінозид, кемпферол-3-глюкуронід, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-α-рамнозид, кемпферол-гексозид, кемпферол-О-пентозид і вільний кверцетин [11]. Зразки листя чорниці, зібрані на півночі Фінляндії у різні вегетаційні періоди, були проаналізовані методом ВЕРХ – після гідролізу ідентифікували і кількісно визначили кверцетин, мірицетин, кемпферол [26].

Листя, стебла і плоди чорниці, зібрані на території Румунії в травні, липні і вересні, були проаналізовані методом ультра-ВЕРХ із мас-детекцією [27]. Листя і стебла характеризувалися високим вмістом флавоноїдів впродовж усіх часових проміжків дослідження, тоді як у плодах вміст флавоноїдів зменшувався починаючи з липня. Кверцетин-3-О-галактозид, кверцетин-3-О-глюкозид, три гексозиди кверцетину, два пентозиди кверцетину і кверцетину рамнозид були виявлені в усіх частинах рослини, як і кверцетин-3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилглутароїл)]-α-рамнозид, який раніше вважали характерним тільки для плодів. Але останній у листі виявляли в липні і вересні, тоді як в стеблах – впродовж усього часу дослідження [27].

Застосовуючи поєднання високоефективних хроматографічних методів із мас-спектральною детекцією, було проаналізовано зразки листя чорниці, зібрані в Ту-

речині і Фінляндії [28]. В усіх зразках були ідентифіковані рутин(кверцетин-3-О-рутинозид), гіперозид (кверцетин-3-О-галактозид), ізокверцитрин (кверцетин-3-О-глюкозид), кверцетин-3-О-глюкуронід та кверцетин-3-О-рамнозид, кверцетин-3-О-ксилозид, кверцетин-3-О-арабінозид, кверцетин-3-О-арабінофуранозид, кверцетин-ацетилглюкозид, кверцетин-3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилглутароїл)]-α-рамнозид, кемпферол-пентозид і кемпферол-рамнозид [28].

У водно-спиртових рідких екстрактах, отриманих з італійських зразків листя чорниці, було ідентифіковано кверцетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-рамнозид, кверцетин-3-О-галактозид, кверцетин-3-О-ксилозид, кверцетин-3-О-арабінозид, кверцетин-3-О-арабінофуранозид та кверцетин-3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилглутароїл)]-α-рамнозид, кемпферол-3-О-[4''-(3-гідрокси-3-метилглутароїл)]-рамнозид і кемпферол-3-О-рамнозид [7].

Як впливає з представленого аналізу даних літератури, компонентний склад глікозидних форм флавоноїдів є різноманітним, що дуже ускладнює стандартизацію власне ЛРС та екстрактів на її основі. При стандартизації, для ідентифікації пагонів чорниці і її екстрактів, необхідно використати хроматографію/високоефективну хроматографію у тонкому шарі сорбенту. Це забезпечить ідентифікацію методом «відбитків пальців», шляхом порівняння отримуваних специфічних хроматографічних профілів випробовуваних розчинів із описаними схемами розташування зон чи хроматографічним профілем розчину порівняння, отриманого для певного «стандартизованого» екстракту. Цей підхід є фармакопейним і за-

стосовується при ідентифікації різних видів ЛРС й екстрактів [1, 2].

При напрацюванні критеріїв кількісної оцінки якості екстрактів пагонів чорниці варто застосувати переведення всіх глікозидних форм флавоноїдів в аглікони, внаслідок чого число видів молекул значно зменшується, що дозволяє спростити і головне – стандартизувати процедуру визначення.

У процесі розробки процедури пробопідготовки сухого екстракту пагонів чорниці для ВЕРХ-визначення агліконів флавоноїдів були досліджені умови гідролізу глікозидів флавоноїдів і вилучення агліконів, підібрані концентрації стандартних розчинів. Запропонована методика приготування випробовуваних розчинів і розчинів порівняння для ВЕРХ-визначення агліконів флавоноїдів у сухому екстракті пагонів чорниці наведена нижче.

Методика пробопідготовки при ВЕРХ-визначенні агліконів флавоноїдів.

Випробовуваний розчин

0,6 г (точна наважка) екстракту поміщали у конічну колбу місткістю 100 мл, додавали 1,0 мл 5 г/л розчину гексаметилентетраміну, 7,0 мл 250 г/л розчину хлоридної кислоти, 40 мл ацетону і кип'ятили 2 год із зворотним холодильником на киплячій водяній бані. Охолоджений розчин кількісно переносили у мірну колбу місткістю 50 мл, промиваючи конічну колбу ацетоном та доводячи об'єм розчину у мірній колбі до позначки, перемішували.

25,0 мл отриманого розчину переносили у ділильну лійку, додавали 25 мл води і тричі екстрагували етилацетатом порціями по 25, 15 і 15 мл впродовж 15 хв щоразу. Об'єднані етилацетатні витяги поміща-

ли у ділильну лійку і двічі промивали водою порціями по 50 мл струшуючи впродовж 5 хв щоразу. Промитий водою етилацетатний витяг фільтрували через паперовий фільтр із 10 г натрію сульфату безводного у колбу і відганяли етилацетат, застосовуючи роторний випарник.

До отриманого сухого залишку додавали 4 мл метанолу, розчиняли із застосуванням ультразвукової бані впродовж 3 хв і кількісно переносили у мірну колбу місткістю 5 мл, додавали 0,4 мл розчину 250 г/л хлоридної кислоти і доводили об'єм розчину метанолом до позначки, перемішували.

Вихідний стандартний розчин

По 10 мг (точна наважка) стандартних зразків мірицетину, кверцетину і кемпферолу поміщали в мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 20 мл метанолу і розчиняли, доводили об'єм розчину метанолом до позначки і перемішували.

Розчин порівняння 1

У мірну колбу місткістю 20 мл поміщали 1,0 мл вихідного стандартного розчину, додавали 1,6 мл розчину 250 г/л хлоридної кислоти і доводили об'єм розчину метанолом до позначки, перемішували.

Розчин порівняння 2

У мірну колбу місткістю 20 мл поміщали 10,0 мл вихідного стандартного розчину, додавали 1,6 мл 250 г/л розчину хлоридної кислоти і доводили об'єм розчину метанолом до позначки, перемішували.

Почергово хроматографували випробовувані розчини і розчини порівняння 1 та 2, отримуючи не менше трьох хроматограм для кожного. Послідовність піків на хроматограмах розчинів порівняння 1 і 2 – мірицетин, кверцетин, кемпферол (рис. 2).

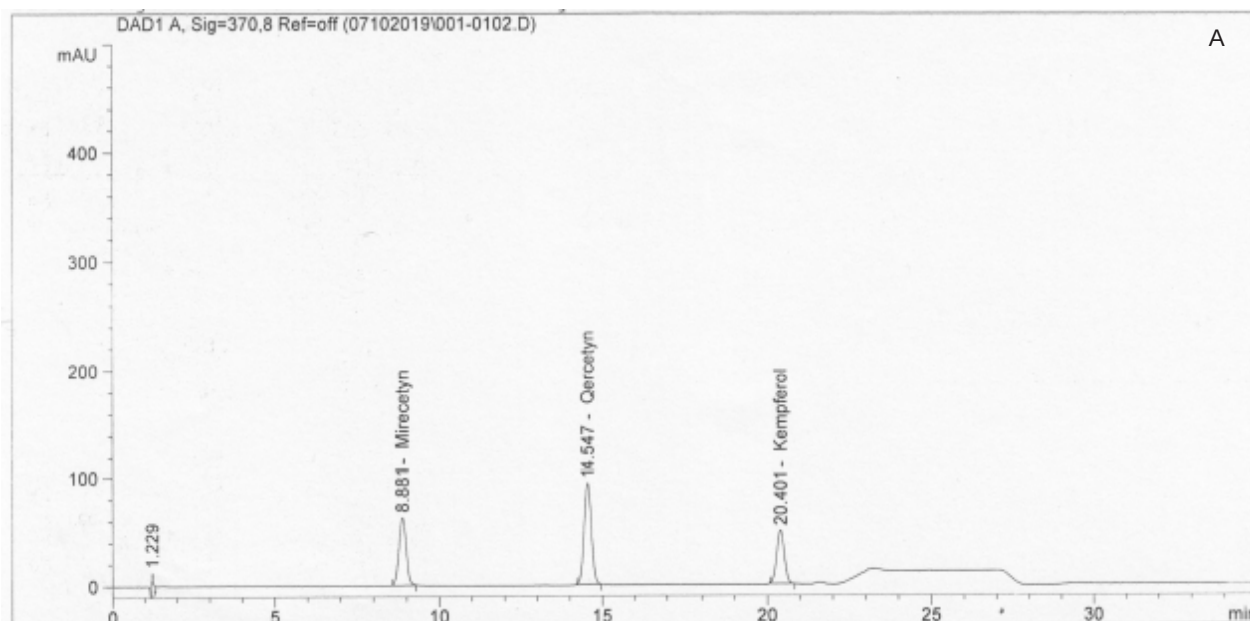


Рис. 2. Хроматограми розчинів порівняння 1 і 2 (А, Б), отримані в умовах дослідження агліконів флавоноїдів сухого екстракту пагонів чорниці.

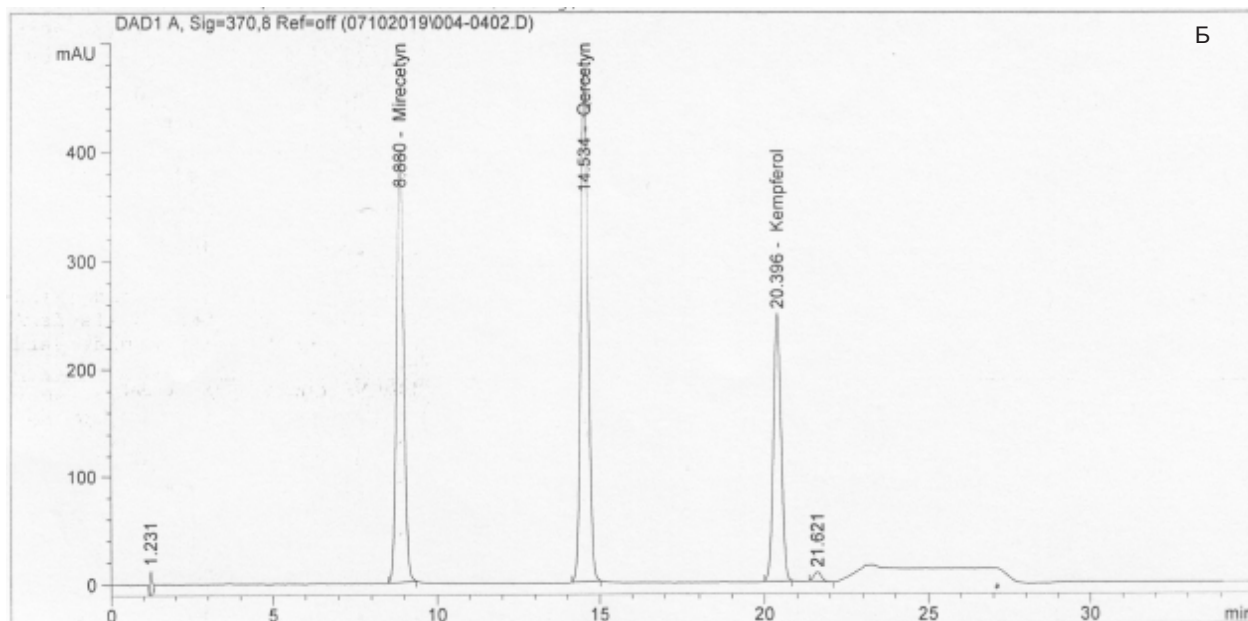


Рис. 2 (продовження). Хроматограми розчинів порівняння 1 і 2 (А, Б), отримані в умовах дослідження агліконів флавоноїдів сухого екстракту пагонів чорниці.

Вміст кверцетину визначали, порівнюючи площі піків кверцетину на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння 2, а вміст мірицетину й кемпферолу визначали, порівнюючи площі піків кверцетину на хроматограмах випробовуваного розчину та розчину порівняння 1 і враховуючи розбавлення та умови пробопідготовки. Результати визначення вмісту агліконів флавоноїдів в сухому екстракті пагонів чорниці наведено у таблиці.

Таким чином, флавоноїди сухого екстракту пагонів чорниці представлені глікозидами трьох агліконів – кверцетину, мірицетину і кемпферолу. Отримані результати добре узгоджуються з даними літератури щодо агліконового складу флавоноїдів у різних органах ЛРС чорниці [18–21, 23–26]. Вміст кверцетину є

найбільшим, мірицетину – суттєво нижчим, а кемпферолу – ще нижчим. Визначений вміст агліконів є близьким між серіями для трьох зразків сухого екстракту пагонів чорниці. Це дозволяє запропонувати кількісне визначення вмісту агліконів методом ВЕРХ як об'єктивний кількісний показник якості при стандартизації сухого екстракту пагонів чорниці. Результат ВЕРХ-визначення агліконів в екстракті окремо і/або сумарно відображає їхній реальний вміст, його можна пов'язувати із особливостями застосовуваних технологічних прийомів, з силою прояву специфічних видів активності, завдяки чому можна виявляти напрямки оптимізації технології екстрактів та лікарських засобів на їхній основі. Це, у свою чергу, забезпечить створення ефективних ЛЗ на основі сухого екстракту пагонів чорниці.

Таблиця

Вміст агліконів флавоноїдів у сухому екстракті пагонів чорниці

Серія екстракту	Вміст у перерахунку на суху речовину, %			
	мірицетин	кверцетин	кемпферол	разом
01	0,068	0,724	0,034	0,826
02	0,098	0,647	0,032	0,777
03	0,083	0,712	0,030	0,825

Висновки. Методом ВЕРХ досліджено агліконовий профіль флавоноїдів сухого екстракту пагонів чорниці, отриманих після кислотного гідролізу, і виявлено у ньому три аглікони: кверцетин, мірицетин, кемпферол. Визначено, що у трьох

серіях досліджуваного сухого екстракту вміст кверцетину становив 0,647–0,724 %, мірицетину – 0,068–0,098 % і кемпферолу – 0,030–0,034 %. Отримані результати дозволяють запропонувати кількісне визначення вмісту агліконів флавоноїдів

методом ВЕРХ (окремо і/або сумарно) як об'єктивний показник якості сухого екстракту пагонів чорниці.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author hasn't conflict of interest to declare.

HPLC-RESEARCH OF THE FLAVONOID AGLYCONES OF BILBERRY SHOOTS DRY EXTRACT

L. V. Vronska

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

vronska_liudmyla@ukr.net

The aim of the work. HPLC-research of the composition and content of flavonoid aglycones in the dry extract of bilberry shoots.

Materials and Methods. Dry extract of the bilberry shoots was obtained by fractional maceration; extractant – ethanol (70-50%, v / v); extraction ratio – 1: 9-15, the multiplicity of extraction – 5, the currency of the one extraction – 24 h. In the study were used: Laborota 4011 rotary evaporator (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Germany), SP-100 drying cabinet (UOSLAB, Ukraine), Mettler Toledo XP205DR analytical scale (Mettler Toledo, Switzerland), Bandelin Sanorex digitec electronic ultrasonic bath (GmbH & Co. KG, Germany), Agilent 1200 liquid chromatograph with G1315D DAD Detector (Agilent, USA), Kromasil 100 C18 (0.125 m x 4.6 mm, 5 µm, Supelco, USA) chromatographic column, aglycones standards (Sigma-Aldrich), chemical reagents of analytical grade and solvents of HPLC-grade (Sigma-Aldrich, Macron Fine Chemicals TM).

Results and Discussion. Three aglycones: myricetin, quercetin and kaempferol were identified by retention time and by the course of electronic absorption spectra from chromatograms of solutions of bilberry shoots dry extracts after acid hydrolysis. As a result of quantitative determination of their content in three series of the extract were found: quercetin – 0.647-0.724%, myricetin – 0.068-0.098% and kaempferol – 0.030-0.034%. The obtained results are consistent with the data of the literature, namely – the dominance of quercetin aglycone and the presence of myricetin and kaempferol or one of them in small amounts in the stems, leaves and fruits of bilberries.

Conclusions. The aglycones profile of flavonoids of bilberry shoots dry extract is represented by three compounds – quercetin, myricetin and kaempferol, the content of quercetin is the highest, and kaempferol – the lowest. Quantitative determination of the aglycones content (separately / total) by HPLC is proposed to be used as an indicator of the quality of the bilberry shoots dry extract.

Key words: bilberry shoots; dry extract; flavonoid aglycones; quercetin; kaempferol; myricetin; HPLC.

ВЭЖХ-ИССЛЕДОВАНИЕ АГЛИКОНОВ ФЛАВОНОИДОВ СУХОГО ЭКСТРАКТА ПОБЕГОВ ЧЕРНИКИ

Л. В. Вронска

Тернопольский национальный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины

vronska_liudmyla@ukr.net

Цель работы. ВЭЖХ-изучение состава и содержания агликонов флавоноидов в сухом экстракте побегов черники.

Материалы и методы. Сухой экстракт побегов черники получали методом дробной мацерации; экстрагент – этанол (70–50% об / об); экстракционное соотношение сырье-экстрагент – 1: 9–15; кратность экстрагирования – 5; время одного экстрагирования – 24 ч. В исследовании применяли: роторный испаритель Laborota 4011 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия), сушильный шкаф СП-100 (UOSLAB, Украина), аналитические весы Mettler Toledo XP205DR (Mettler Toledo, Швейцария), ультразвуковую баню Bandelin Sanorex digitec (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Германия), жидкостный хроматограф Agilent 1200 с детектором G1315D DAD Detector («Agilent», США), хроматографическую колонку Kromasil 100 C18 (0,125 м x 4,6 мм, 5 мкм, Supelco, США), стандарты агликонов (Sigma-Aldrich), химические реактивы аналитической чистоты и растворители для градиентного элюирования (Sigma-Aldrich, Macron Fine Chemicals TM).

Результаты и обсуждение. Хроматографирование проб сухих экстрактов побегов черники после кислотного гидролиза позволило идентифицировать по времени удерживания и по ходу электронных спектров поглощения три агликona: мирицетин, кверцетин и кемпферол. При количественном определении их содержания в трех сериях экстракта найдено: кверцетина – 0,647–0,724 %, мирицетина – 0,068–0,098 % и кемпферола – 0,030–0,034 %. Полученные результаты согласуются с данными литературы, а именно – доминирование кверцетина и присутствие мирицетина и кемпферола или одного из них в незначительных количествах в стеблях, листьях и плодах черники.

Выводы. Агликоновый профиль флавоноидов сухого экстракта побегов черники представлен тремя соединениями – кверцетином, мирицетином и кемпферолом, содержание кверцетина является доминирующим, а кемпферола – наиболее низким. Количественное определение содержания агликонов (индивидуальное/суммарное) методом ВЭЖХ предложено использовать как показатель качества сухого экстракта побегов черники.

Ключевые слова: побеги черники; сухой экстракт; агликоны флавоноидов; кверцетин; кемпферол; мирицетин; ВЭЖХ.

Список бібліографічних посилань

1. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Доповнення 2. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. 336 с.
3. Witzell J., Rolf Gref, Torgny Näsholm. Plant-part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003. Vol. 31. P.115-127.
4. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants / Ye Tian et al. *Food Chem*. 2017. Vol. 220. P. 266-281.
5. Phenolic compounds from five ericaceae species leaves and their related bioavailability and health benefits / B. E. Ștefănescu. *Molecules*. 2019. Vol. 24, Iss. 11. P. 2046.
6. Zushang Su. Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium L.* *Pharmaceutical Crops*. 2012. Vol. 3. P. 7-37.
7. Phenolic distribution in liquid preparations of *Vaccinium myrtillus L.* and *Vaccinium vitis idaea L.* / Francesca Ieri et al. *Phytochem. Anal.* 2013. Vol. 24, Iss. 5. P. 467-475.
8. Bioactive components and the effect of hydroalcoholic extract of *Vaccinium myrtillus* on postprandial atherosclerosis risk factors in rabbits / Y. Madihi. *Pak. J. Med. Sci.* 2013. Vol. 29, Iss. 1. P. 384-389.
9. Aaby K., Grimmer S., Holtung L.. Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) press residue: effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT – Food Science and Technology*. 2013. Vol. 54, Iss. 1. P. 257-264.
10. Tumor suppression effects of bilberry extracts and enzymatically modified isoquercitrin in early preneoplastic liver cell lesions induced by piperonyl butoxide promotion in a two-stage rat hepatocarcinogenesis model / Shintaro Hara et al. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2014. Vol. 66. P. 225-234.
11. Identification of phenolic compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea L.*), Bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) and hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium Ruthe L.*) leaves / J. Hokkanen et al. *J. Agric. Food Chem.* 2009. Vol. 57, Iss. 20. P. 9437-9447.
12. Vronska L.V., Chubka M.B., Demyd A.Ye. Development of phenolic compounds chromatographic identification in bilberry shoots. *Фармац. часопис*. 2015. № 3. P. 28-33.
13. Куркин В. А., Рязанова Т. К. Количественное определение суммы флавоноидов в побегах черники обыкновенной. *Химико-фармац. журн.* 2013. Т. 47, № 4. С. 34–37.
14. Вронська Л. В. Розробка спектрофотометричної методики визначення флавоноїдів у пагонах чорниці звичайної. *Фармац. часопис*. 2018. № 4. С. 49–56.
15. Вронська Л. В., Івануса І. Б. Розробка спектрофотометричної методики визначення флавоноїдів у сухому екстракті пагонів чорниці. *Фармац. часопис*. 2019. № 3. С. 43–50.
16. Ice C.H., Wender S. H. Quercetin and its glycosides in leaves of *Vaccinium myrtillus*. *J. Am. Chem. Soc.* 1953. Vol. 75, Iss. 1. P. 50-52.
17. Friedrich H., Schönert J. Phytochemical investigation of leaves and fruits of *Vaccinium myrtillus*. *Planta Medica*. 1973. Vol. 25, Iss. 05. P. 90-100.
18. Häkkinen S., Auriola S. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *J. Chromatography A*. 1998. Vol. 829, Iss. 1-2. P. 91–100.
19. Häkkinen S.H., Törrönen A.R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research Intern.* 2000. Vol. 33, Iss. 6. P. 517-524.
20. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries / S. Häkkinen et al. *Food Research Intern.* 1999. Vol. 32, Iss. 5. P. 345-353.
21. Pellissier F. Allelopathic effect of phenolic acids from humic solutions on two spruce mycorrhizal fungi: *Cenococcum graniforme* and *Laccaria laccata*. *J. Chem. Ecology*. 1993. Vol. 19, Iss. 10. P. 2105-2114.
22. Fraisse D., Carnat A., Lamaison J. L. Composition polyphénolique de la feuille de myrtille. *Ann. Pharm. Fr.* 1996. Vol. 54, Iss. 6. P. 280-283.
23. Taruscio T.G., Barney D.L., Exon J. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of north-west *Vaccinium* berries. *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52, Iss. 10. P. 3169-3176.
24. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species / K. R. Määttä-Riihinen et al. *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52, Iss. 14. P. 4477-4486.

25. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and "northblue" blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*) / K. Riihinen et al. *Food Chem.* 2008. Vol. 110, Iss. 1. P. 156–160.
26. Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients / F. Martz et al. *J. Chemical Ecology.* 2010. Vol. 36, Iss. 9. P. 1017-1028.
27. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity / O.-C. Bujor et al. *Food Chemistry.* 2016. Vol. 213. P. 58-68.
28. Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) / P. Liu et al. *J. Agric. Food Chem.* 2014. Vol. 62, Iss. 49. P. 12015-12026.

References

1. The State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 vol. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. Ed.2. Vol. 3. [Derzhavna Farmakopeya Ukrainy: v 3 t. / DP «Ukrayinskyi naukovy farmakopeynyy tsentr yakosti likarskykh zasobiv». – 2-e vyd.] Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. 2014. Ukrainian.
2. The State Pharmacopoeia of Ukraine : Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. Ed.2, addition 2. [Derzhavna Farmakopeya Ukrainy / DP «Ukrayinskyi naukovy farmakopeynyy tsentr yakosti likarskykh zasobiv». – 2-e vyd. – Dopovnennyya 2.] Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. 2018; Ukrainian.
3. Witzell J, Rolf Gref, Torgny Näsholm. Plant-part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (*Vaccinium myrtillus*) plants. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2003;31:115-27. doi: 10.1016/S0305-1978(02)00141-2
4. Tian Y, Liimatainen J, Alanne A-L, Lindstedt A, Liu P, Sinkkonen J, et al. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chem.* 2017;220:266-81. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.145
5. Ștefănescu BE, Szabo K, Mocan A, Crișan G. Phenolic compounds from five ericaceae species leaves and their related bioavailability and health benefits. *Molecules.* 2019;24(11):2046. doi: 10.3390/molecules24112046
6. Zushang Su. Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium* L. *Pharmaceutical Crops.* 2012;3:7-37. doi: 10.2174/2210290601203010007
7. Ieri F, Martini S, Innocenti M, Mulinacci N. Phenolic distribution in liquid preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L. *Phytochem. Anal.* 2013;24(5):467-75. doi: 10.1002/pca.2462
8. Madihi Y, Merrikhi A, Setorki M, Baradaran A, Ghobadi S, Shahinfard N, et al. Bioactive components and the effect of hydroalcoholic extract of *Vaccinium myrtillus* on postprandial atherosclerosis risk factors in rabbits. *Pak. J. Med. Sci.* 2013;29(1):384-9. doi: 10.12669/pjms.291(Suppl).3539
9. Aaby K, Grimmer S, Holtung L. Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT – Food Science and Technology.* 2013;54(1):257-64. doi: 10.1016/j.lwt.2013.05.031
10. Hara S, Morita R, Ogawa T, Segawa R, Takimoto N, Suzuki K, et al. Tumor suppression effects of bilberry extracts and enzymatically modified isoquercitrin in early preneoplastic liver cell lesions induced by piperonyl butoxide promotion in a two-stage rat hepatocarcinogenesis model. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2014;66:225-34. doi: 10.1016/j.etp.2014.02.002
11. Hokkanen J, Mattila S, Jaakola L, Pirttilä AM, Tolonen A. Identification of phenolic compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57(20):9437-47. doi: 10.1021/jf9022542
12. Vronska LV, Chubka MB, Demyd AYe. Development of phenolic compounds chromatographic identification in bilberry shoots. *Pharm. Review.* 2015; 3:28-33. doi: 10.11603/2312-0967.2015.3.4951
13. Kurkin VA, Riazanova TK. [Quantitative determination of the flavonoids amount in the bilberries shoots]. *Chemiko-pharmaceuticals. zhurn.* 2013;47(4):34-7. Russian
14. Vronska LV. [Development of spectrophotometric method of flavonoids determination in bilberry shoots]. *Pharm. Review.* 2018;4:49-56. doi: 10.11603/2312-0967.2018.4.9703. Ukrainian
15. Vronska LV, Ivanusa IB. [Development of spectrophotometric method of flavonoids determination in the bilberry shoots dry extract]. *Pharm. Review.* 2019;3: 43-50. doi: 10.11603/2312-0967.2019.3.10463. Ukrainian
16. Ice CH, Wender SH. Quercetin and its glycosides in leaves of *Vaccinium myrtillus*. *J. Am. Chem. Soc.* 1953;75(1):50-2. doi: 10.1021/ja01097a013
17. Friedrich H, Schönert J. Phytochemical investigation of leaves and fruits of *Vaccinium myrtillus*. *Planta Medica.* 1973;25(05):90-100. doi:10.1055/s-0028-1099474
18. Häkkinen S, Auriola S. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *J. Chromatography A.* 1998;829(1-2):91-100. doi:10.1016/S0021-9673(98)00756-0
19. Häkkinen SH, Törrönen AR. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research Intern.* 2000;33(6):517-24. doi:10.1016/S0963-9969(00)00086-7
20. Häkkinen S, Heinonen M, Kärenlampi S, Mykkänen H,

- Ruuskanen J, Törrönen R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research Inter.* 1999;32(5):345-53. doi:10.1016/s0963-9969(99)00095-2
21. Pellissier F. Allelopathic effect of phenolic acids from humic solutions on two spruce mycorrhizal fungi: *Cenococcum graniforme* and *Laccaria laccata*. *J. Chem. Ecology.* 1993;19(10):2105-14. doi: 10.1007/bf00979650
22. Fraisse D, Carnat A, Lamaison J L. Composition polyphénolique de la feuille de myrtille. *Ann. Pharm. Fr.* 1996;54(6):280-3. French
23. Taruscio TG, Barney DL, Exon J. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(10):3169-76. doi: 10.1021/jf0307595
24. Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen scandinavian berry species. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(14):4477-86. doi:10.1021/jf049595y
25. Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and "northblue" blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem.* 2008;110(1):156-60. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.057
26. Martz F, Jaakola L, Julkunen-Tiitto R, Stark S. Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients. *J. Chemical Ecology.* 2010;36(9):1017-28. doi:10.1007/s10886-010-9836-9
27. Bujor O-C, Le Bourvellec C, Volf I, Popa VI, Dufour C. Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chemistry.* 2016;213:58-68. doi:10.1016/j.foodchem.2016.06.042
28. Liu P, Lindstedt A, Markkinen N, Sinkkonen J, Suomela J-P, Yang B. Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2014;62(49):12015-26. doi:10.1021/jf503521m

Відомості про автора

Вронська Л. В. – канд. хім. наук, доцент кафедри фармації, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна. E-mail: vronska_liudmyla@ukr.net, ORCID 0000-0002-7223-6966.

Information about the author

Vronska L. V. – PhD (Chemistry), Associate Professor of the Pharmacy Department, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine. E-mail: vronska_liudmyla@ukr.net, ORCID 0000-0002-7223-6966.